



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICO BIOLÓGICAS
Unidad de Investigación Especializada en Microbiología

Maestría en Ciencias Biomédicas

Laboratorio de Investigación en Obesidad y Diabetes

Variantes genéticas en *FPGS* y *GGH* y su asociación con la
respuesta y toxicidad al tratamiento con metotrexato en
pacientes con artritis reumatoide

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA

Q.B.P. JOSÉ MANUEL NÁJERA MALDONADO

DIRECTORA DE TESIS: DRA. IRIS PAOLA GUZMÁN GUZMÁN

CODIRECTOR: DR. JOSÉ EDUARDO NAVARRO ZARZA

CHILPANCINGO DE LOS BRAVO, GRO. DICIEMBRE DE 2019

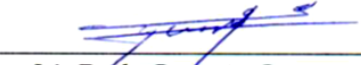



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS


ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS


En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 12 días del mes de julio de dos mil diecinueve se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada “**Variantes genéticas en FPGS y GGH y su asociación con la respuesta y toxicidad al tratamiento con metotrexato en pacientes con artritis reumatoide**”, presentada por el alumno **José Manuel Nájera Maldonado**, para obtener el Grado de Maestría en Ciencias Biomédicas. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

El Comité Tutorial


Dra. Iris Paola Guzmán Guzmán
Dirección de tesis


Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero


Dra. Ma. Elena Moreno Godínez


Dra. Isela Parra Rojas

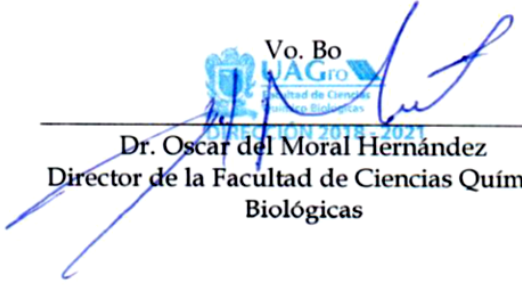


Dr. José Eduardo Navarro Zarza

Vo. Bo


Daniel Hernández Sotelo
Coordinador de la Maestría en Ciencias Biomédicas

FCQB | Coordinación de Ciencias Biomédicas | DIRECCIÓN 2018 - 2021

Vo. Bo


Dr. Oscar del Moral Hernández
Director de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas

FCQB | Coordinación de Ciencias Biomédicas | DIRECCIÓN 2018 - 2021

Variantes genéticas en *FPGS* y *GGH* y su asociación con la respuesta
y toxicidad al tratamiento con metotrexato en pacientes con artritis
reumatoide

El presente trabajo se realizó en los Laboratorios de Investigación:

- Laboratorio de Investigación en Obesidad y Diabetes
- Laboratorio de Proteómica y Genómica Funcional

De la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero.

Asesorado por:

Dra. Iris Paola Guzmán Guzmán

Dra. Ma. Elena Moreno Godínez

Dra. Isela Parra Rojas

Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero

Dr. José Eduardo Navarro Zarza

Durante el periodo el alumno fue Becario CONACYT. Número de registro (CVU/Becario): 857828/627641.

Dedicatorias

A mi mamá Amalia, gracias por ayudarme a cumplir una más de mis metas, por estar todo el tiempo a mi lado y apoyarme a cada paso del camino, por darme tu cariño incondicional aun en las épocas más difíciles.

A mi tío German, por ser un padre para mí, por darme sus consejos, preocuparse por todos los aspectos de mi vida, así como su apoyo en la culminación de todas mis metas académicas y personales.

AGRADECIMIENTOS

Dra. Iris Paola Guzmán, muchas gracias por la confianza depositada en mí, por los consejos, por impartir su conocimiento y sobre todo por la ayuda tanto personal como en el desarrollo y culminación de este trabajo de investigación.

Dr. Eduardo Navarro, por apoyarme, brindarme conocimiento, tiempo y experiencia para la elaboración de este trabajo.

Gracias a todo mi comité evaluador. **Dra. Luz del Carmen**, por su apoyo en el fortalecimiento de este trabajo y enseñanza desde la licenciatura como coordinadora de seminario y ahora como sínodo. **Dra. Isela**, por permitirme entrar a su laboratorio, su contribución y apoyo para este trabajo. **Dra. Ma. Elena**, por darme ánimo y por sus aportaciones para este trabajo.

A todos mis compañeros de la maestría, a mis amigos: Roberto, Isimar, Ileana, Sara, Sandra, Dimas, Magdalena, Fernando, Ivon, Sayuri, Oscar y a todas aquellas personas que han aportado en mi crecimiento personal y profesional.

ÍNDICE

I. RESUMEN	2
II. ABSTRACT	3
III. INTRODUCCIÓN	4
IV. MATERIAL Y MÉTODOS.....	12
V. RESULTADOS.....	18
VI. DISCUSIÓN	28
VII. CONCLUSIONES	34
VIII. REFERENCIAS.....	35

I. RESUMEN

El metotrexato (MTX) es un fármaco seguro y eficaz en el tratamiento de la artritis reumatoide (AR), sin embargo, algunos pacientes presentan una pobre respuesta terapéutica, o manifestaciones adversas y tóxicas relacionadas con el consumo del fármaco. Se ha descrito que, polimorfismos en los genes de proteínas involucradas en el metabolismo del MTX pueden estar involucrados en la variabilidad de la respuesta a la terapia en AR. **Objetivo.** Evaluar la asociación de los polimorfismos de los genes *FPGS* (rs1544105 -2572 C>T) y *GGH* (rs11545078 452C>T y rs3758149 -401 C>T) con marcadores de toxicidad y de respuesta al tratamiento con MTX en pacientes con AR. **Material y métodos.** 159 pacientes atendidos en el Hospital General de Chilpancingo., Gro, fueron evaluados. Se determinaron parámetros clínicos, dosis promedio de MTX prescrita, marcadores de inflamación y frecuencia de eventos adversos asociados al consumo de MTX. Además, se determinaron parámetros de toxicidad hepática y renal a partir del análisis bioquímico de las muestras y parámetros hematológicos. La identificación de los polimorfismos en los genes de *FPGS* y *GGH* se realizó mediante el método PCR-RFLP. El análisis de los datos se realizó utilizando los softwares STATA. v13.0, SHEsis y GraphPad Prims. **Resultados.** Los pacientes con AR presentaron alteración de los parámetros de función hepática, renal, y eventos adversos asociados al consumo de MTX. Una proporción aproximada del 50% presentó parámetros de pobre respuesta al tratamiento. El haplotipo TC de los polimorfismos -401 C>T y 452C>T de *GGH* se asoció con pobre respuesta al tratamiento y niveles de urea alterados, mientras que el haplotipo TT se asoció con la presencia de parámetros de función hepática elevados a bajas dosis de MTX administrado. El polimorfismo -2572 de *FPGS* se asoció principalmente con niveles de ácido úrico alterados y la presencia de úlceras orales. **Conclusión.** Los polimorfismos en el gen *GGH* y *FPGS* se asocian (OR, $p<0.05$) con la presencia de eventos tóxicos, adversos y de pobre respuesta al tratamiento con MTX en pacientes con AR del estado de Guerrero, México.

Palabras clave: Metotrexato, polimorfismos, *FPGS*, *GGH*, artritis reumatoide, toxicidad.

II. ABSTRACT

Methotrexate (MTX) is a safe and effective drug used to treatment of rheumatoid arthritis (RA), however, some patients have a poor therapeutic response or adverse and toxic manifestations related to MTX use. It has been described that polymorphisms in the genes involved in MTX metabolism may be involved in the variability of the response to therapy in RA patients. **Objective.** To evaluate the association of polymorphisms of the genes *FPGS* (rs1544105 -2572 C> T) and *GGH* (rs11545078 452C> T and rs3758149 -401 C> T) with markers of toxicity and response to MTX treatment in patients with RA. **Material and methods.** 159 patients attended in the General Hospital of Chilpancingo., Gro, were evaluated. Clinical parameters, average dose of prescribed MTX, markers of inflammation, frequency of adverse events associated with MTX consumption were determined. In addition, hepatic and renal parameters were determined from the biochemical analysis of the samples and hematological parameters. The polymorphisms in *FPGS* and *GGH* genes were identified using the PCR-RFLP method. Data analysis was performed using software's; STATA v13.0, SHEsis and GraphPad Prims. **Results.** The RA patients had hepatic parameters and of renal function impaired, and adverse events associated with MTX consumption. Approximately 50% patients showed parameters of poor response to treatment. The haplotype CT (-401 C> T and 452C> T of *GGH*) was associated with poor treatment response and impaired urea levels, while the TT haplotype was associated to the presence of elevated hepatic parameters, inclusive at low doses of MTX administered. *FPGS* -2572 polymorphism was primarily associated with altered uric acid levels and oral ulcers presence. **Conclusion.** Polymorphisms in the *GGH* and *FPGS* genes are positively associated with the presence of toxic, adverse events and poor response to MTX treatment in patients with RA from guerrero state, méxico.

Keywords: Methotrexate, polymorphisms, *FPGS*, *GGH*, rheumatoid arthritis, toxicity.

III. INTRODUCCIÓN

La artritis reumatoide (AR) es uno de los trastornos autoinmunes más comunes, de etiología multifactorial que incluye factores de susceptibilidad genética y del entorno de los pacientes (Chauhan y Al-Dhahir, 2019). Representa una enfermedad crónica, sistémica y progresiva, que evoluciona hacia el daño articular e incapacidad funcional si no se diagnostica y trata oportunamente (Morales, 2013).

Los signos y síntomas relacionados con la enfermedad, tales como el dolor, la inflamación y rigidez, se deben a la infiltración intra articular de células proinflamatorias, así como a la activación de fibroblastos que residen en las articulaciones afectadas y que adoptan un fenotipo “cuasi maligno”, caracterizado por la formación del *pannus* resultante de la hiperplasia sinovial que invade el cartílago adyacente y por la síntesis de citocinas que promueven la inflamación y producción de enzimas proteolíticas que conducen al daño estructural del cartílago, hueso y tendón (Isaacs, 2010). En la Figura 1 se representan los mecanismos celulares que conllevan al daño en las articulaciones de pacientes con AR (Zampeli, *et al.*, 2015).

Existen diversas herramientas de medición de la actividad clínica en los pacientes con AR, así como de la capacidad funcional, el daño estructural, la calidad de vida, así como de la respuesta al tratamiento. Los criterios de respuesta al tratamiento de la EULAR (Liga Europea Contra el Reumatismo, *del inglés The European League Against Rheumatism*) clasifican a los pacientes como “no respondedores”, “moderadamente respondedores” o “buenos respondedores”, dependiendo del nivel de actividad clínica y del cambio en la actividad de la enfermedad a través del tiempo, utilizando puntaje de actividad de la enfermedad valorado en 28 articulaciones (DAS28) (DAS *del inglés, The development of the disease activity score*) (Van Riel y Renskers, 2014).

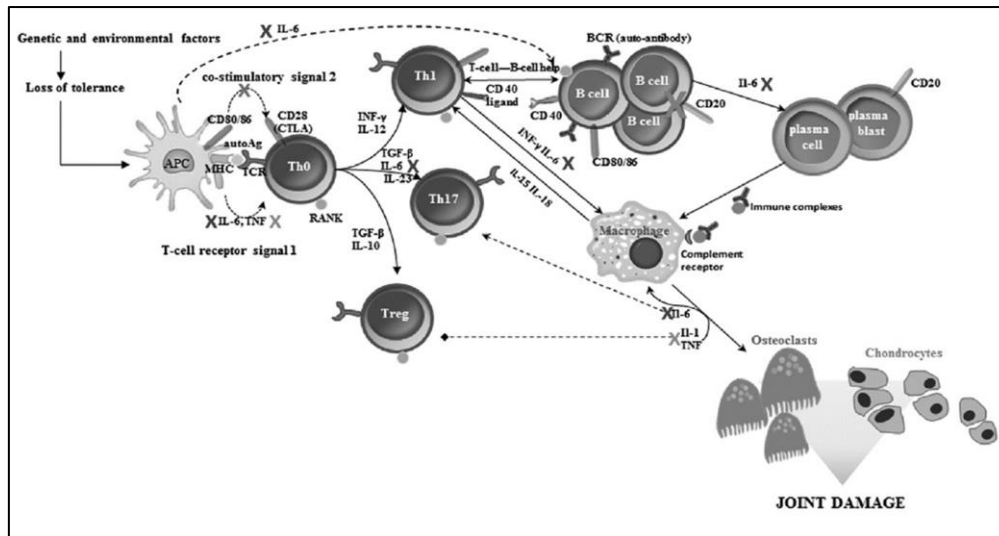


Figura 1. Fisiopatología de la artritis reumatoide. Las células presentadoras de antígeno (APC) presentan antígenos propios o no propios de las células T, que se diferencian en células Th1 o Th17, sus productos secretados inducen la segregación de citocinas proinflamatorias por parte de los macrófagos y promueven la activación y diferenciación de LB a células plasmáticas productoras de auto anticuerpos. Los anticuerpos pueden unirse a los receptores del complemento y/o los receptores Fc en macrófagos, aumentando la secreción de TNF, IL-1 e IL-6. Estas citoquinas conducen a las manifestaciones clínicas y de laboratorio de la AR, así como al daño del cartilago y hueso, principalmente a través del sistema RANKL/RANK que conduce a la activación de condrocitos y osteoclastos. También pueden alterar y activar la diferenciación y la función de las células T y las células B. Las células Treg pueden inhibir la función de las células Th1 y Th17 en un entorno fisiológico, pero son inhibidas por las citoquinas producidas en este entorno inflamatorio. Tomado de Zampeli *et al.*, 2015.

La EULAR ha diseñado los esquemas terapéuticos para el tratamiento de la AR, recomendando el uso de medicamentos antirreumáticos denominados fármacos modificadores de la enfermedad (DMARDs, *del inglés disease-modifying antirheumatic drugs*). Éstos incluyen agentes químicos, como el metotrexato (MTX), hidroxicloroquina o cloroquina, sulfasalazina y leflunomida; DMARDs que pueden acompañarse con glucocorticoides (GC) (Smolen, *et al.*, 2016). Estos medicamentos pueden detener, o al menos minimizar, la progresión del daño articular y se pueden utilizar en monoterapia o terapia combinada en función de la respuesta al tratamiento (Smolen *et al.*, 2017).

La EULAR recomienda como primera línea de tratamiento el uso de MTX (25 mg / semana, dosis tope) combinado con bajas dosis de GC a corto plazo, con el objetivo de que el paciente presente una mejora >50% después de 3 meses bajo tratamiento, y el control de la AR dentro de los 6 meses siguientes; si no hay respuesta al tratamiento se recomienda la combinación con otros DMARDs sintéticos o de tipo biológico. (Smolen *et al.*, 2017), así como el uso temporal de fármacos

antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), a fin de reducir el dolor, la rigidez y mejorar la función física, mientras que los glucocorticoides ofrecen efectos rápidos sintomáticos y modificadores de la enfermedad, aunque su consumo a largo plazo de asocia con efectos secundarios graves (Smolen *et al.*, 2016).

La administración intramuscular de MTX ayuda en la reducción del principal efecto secundario asociado con la ingesta por vía oral, las náuseas. En las dosis típicamente utilizadas en el tratamiento de AR, la biodisponibilidad del metotrexato oral varía considerablemente entre individuos, en general es de aproximadamente el 70%. El MTX es un análogo del ácido fólico, por lo que su absorción intracelular tiene lugar a través del transportador reducido de folato (RFC). La biodisponibilidad del fármaco es mediada por el RFC1, en el intestino delgado superior, sitio que exhibe una mayor expresión de este transportador (Yuasa, Inoue y Hayashi, 2009). Una vez dentro de la célula, el MTX sufre modificaciones que le permiten su permanencia o salida de la célula. La enzima folilpoliglutamato sintetasa (FPGS) agrega residuos de glutamato a la molécula, dando como resultado poliglutamatos de MTX. El MTX poliglutamado se une de manera competitiva y con mayor afinidad a las enzimas blanco de la dehidrofolato reductasa que convierten el dihidrofolato en tetrahydrofolato, una lanzadera del grupo metilo requerida para la síntesis de novo de purinas (Korell *et al.*, 2014). La vida media del MTX en suero es de 6 a 8 horas posterior a su administración y es indetectable en suero después de 24 horas (Tian y Cronstein, 2007).

Los poliglutamatos de metotrexato (MTXPG) se almacenan en los tejidos, incluidos el hígado y los eritrocitos, durante períodos prolongados de tiempo. El mecanismo de acción descrito del MTX consiste en el bloqueo de la síntesis de purinas y pirimidinas al inhibir varias enzimas clave. La inhibición de la dihidrofolato reductasa (DHFR) disminuye los niveles de tetrahydrofolato (THF), lo que da como resultado una metilación de DNA atenuada, así como la inhibición de la timidilato sintetasa (TS) una enzima encargada de la síntesis de novo de bases puricas y pirimidicas, interfiriendo la síntesis de ADN. Los metabolitos intermediarios de la vía para la síntesis de purinas y pirimidinas son responsables de efectos secundarios como, la toxicidad

hepática, estomatitis y la supresión de la médula ósea. El efecto farmacológico del MTX a partir de la inhibición de la síntesis de purina y pirimidina y de la supresión de las reacciones de transmetilación resultan en la reducción de la proliferación de células dependientes de antígeno y la liberación de adenosina, regulando el proceso inflamatorio (Tian y Cronstein, 2007). En la Figura 2 se representa el metabolismo celular de los folatos (MTX) (Organista *et al.*, 2013).

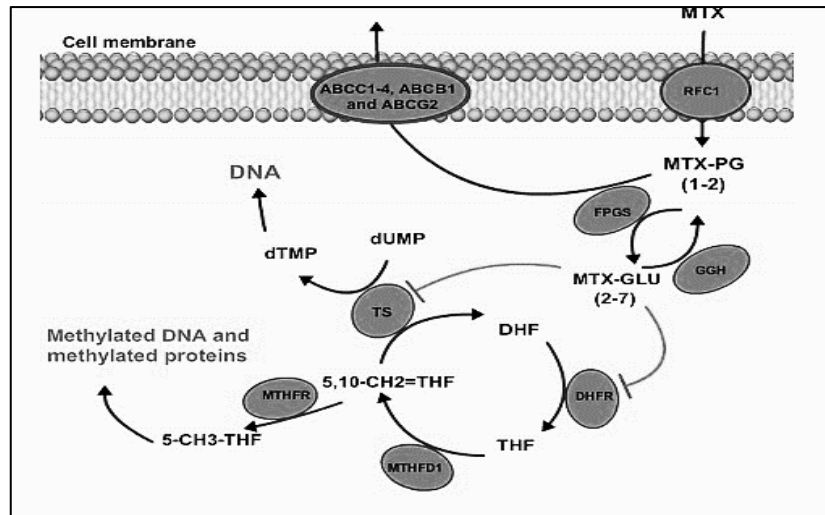


Figura 2. Metabolismo celular del metotrexato. El metotrexato ingresa a las células a través del transportador reducido de folato (RFC1) u otros sistemas de transporte. Su principal blanco intracelular es la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR), cuya inhibición da como resultado la acumulación de dihidrofolato (DHF) y el agotamiento de los folatos celulares. La folilpoliglutamil sintasa citosólica (*FPGS*) agrega residuos de glutamato al metotrexato para producir poliglutamatos de metotrexato (MTXPG), los cuales son retenidos por la célula y el resultado aumenta la eficacia del metotrexato. La adición de residuos de glutamato al metotrexato también aumenta su afinidad por otras enzimas diana [timidilato sintetasa (*TS*) y dihidrofolato reductasa (*DHFR*)]. Otras enzimas que se ven afectadas indirectamente por el metotrexato son: 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa (*MTHFR*) y metilentetrahidrofolato deshidrogenasa (*MTHFD1*). dTMP, monofosfato de desoxitimidina; dUMP, desoxiuridina monofosfato; THF, tetrahidrofolato. Tomado de Organista *et al.*, 2013.

El MTX puede abandonar la célula a través de transportadores de salida, los residuos de glutamato deben ser removidos, estableciéndose una tasa de poliglutamación que está determinada por la actividad de *FPGS*, pero también de la enzima γ -glutamato hidrolasa (*GGH*). La remoción de los residuos de glutamato por la *GGH* permite la salida del MTX de la célula, limitando su efecto crónico y toxicidad de la célula (Korell *et al.*, 2014). Para salir de la célula, el MTX depende completamente de la función de transportadores específicos que pertenecen a las dos superfamilias principales, los transportadores de portadores de soluto y los transportadores de casete de unión a ATP (Inoue y Yuasa, 2014). El MTX se elimina

del cuerpo a través de vías biliares y urinarias. La mayor parte del fármaco excretado en la bilis pasa a través del intestino y se elimina en las heces, pero también está sujeto a una reabsorción intestinal parcial y al metabolismo por bacterias entéricas. La excreción de MTX por el riñón a través de la orina es el resultado de la filtración glomerular y la secreción tubular (Morrison *et al.*, 1987).

Dosis altas de MTX disminuyen la biodisponibilidad, y se atribuye a que el receptor de folato es saturado, lo que limita la captación de MTX independientemente de la dosis usada. Otro evento importante está relacionado con la agregación de residuos de glutamato. La adición de estos residuos prolonga la vida media del MTX durante días o meses dentro de las células (Cronstein, 2005).

En un ensayo experimental con ratas macho tratadas con MTX en dosis altas, se observó que 5 días después de la administración del fármaco, las ratas presentaron alteraciones en biomarcadores séricos de lesión renal, así como en marcadores de estrés oxidativo lo que indica un efecto tóxico relacionado con el tratamiento (Heidari *et al.*, 2018). Uno de los mecanismos para la eliminación de xenobioticos (MTX) es mediada por citocromos, en el caso del MTX el P450 es la principal enzima involucrada en el aclaramiento del MTX y se ha observado que el MTX puede modular las concentraciones de RNAm del citocromo P450, lo que podría contribuir con la toxicidad principalmente a nivel hepático (Cheung *et al.*, 1996).

Un porcentaje significativo de pacientes puede presentar reacciones adversas al MTX, por lo que interrumpen el consumo del fármaco (Romão *et al.*, 2014). Habitualmente, el MTX es bien tolerado, pero en pacientes susceptibles puede provocar efectos adversos a nivel hematológico, gastrointestinal, hepático, cutáneo, neurológico o pulmonar, algunos de los cuales pueden ser graves, por lo que requiere una cuidadosa y analítica monitorización clínica (Torneró *et al.*, 2016). La toxicidad y la respuesta de los pacientes a MTX tienen diferentes causas, incluidas características genéticas y biológicas.

En un estudio realizado por Dervieux *et al.*, 2010 se reportó que, el incremento en la edad de los pacientes, se relaciona con el mantenimiento de niveles máximos de MTX por un mayor tiempo, así como la disminución de la tasa de filtración glomerular

también conlleva a un incremento de los niveles máximos de MTX. Una mayor exposición o una escalada en la dosis de MTX produce una acumulación selectiva de MTXPG de cadena larga; de igual manera, la vía de administración tiene un papel importante en la biodisponibilidad de MTX (Dervieux *et al.*, 2010). El MTXPG de cadena larga tiene una mayor vida media en comparación con el de cadena corta, lo cual puede generar toxicidad cuando la administración del MTX es por tiempo prolongado.

La elevación de las aminotransferasas (transaminitis 2-3 veces los valores normales) es una reacción adversa importante observada con el uso a largo plazo de MTX. Sotoudehmanesh *et al.*, 2010 observaron que de 286 pacientes, el 23.7% padecían transaminitis (Sotoudehmanesh *et al.*, 2010). Otras alteraciones hematológicas o renales han sido asociadas con el uso de MTX. Dorababu *et al.*, 2012, reportaron una reducción en el recuento total de leucocitos dependiente de la dosis de uso del MTX. En un estudio retrospectivo realizado por May *et al.*, 2014 en 194 pacientes tratados con HDMTX (metotrexato a altas dosis), la toxicidad renal se produjo en el 9.1% (May *et al.*, 2014). La alteración renal podría contribuir a la alteración de las concentraciones plasmáticas del MTX, asociándose a la manifestación de otros efectos adverso-tóxicos.

Los polimorfismos pueden dar lugar a variaciones funcionales relacionadas con la susceptibilidad al desarrollo de una enfermedad. Estas variaciones en el DNA pueden estar localizadas en la región promotora del gen, influenciando la actividad transcripcional de ésta; en intrones, modulando la estabilidad de la proteína; o en sitios de “splicing” (Caratachea., 2007). Se han descrito polimorfismos en las enzimas encargadas del metabolismo del MTX que por su localización en el gen se han relacionado con cambios en la respuesta al tratamiento al modificar la actividad o la cantidad de las enzimas (Oppeneer *et al.*, 2012).

El polimorfismo -401C>T de *GGH*, localizado en el promotor del gen, reveló en un ensayo de luciferasa que la presencia del polimorfismo, incrementa en 1.6 a 2 veces la actividad del promotor de *GGH*. En las células MCF-7, las variantes polimórficas de los SNP -401 C>T y -124 T> G se relacionaron con una intensidad de luciferasa

media significativamente mayor, con respecto a la cuantificada en células portadores del alelo silvestre. El polimorfismo en +452 cambia el codón 127 de la proteína *GGH*, generando un cambio de treonina a isoleucina, reportándose que el cambio de aminoácidos disminuye la actividad enzimática (Chave *et al.*, 2003). Por otra parte, se ha descrito que el polimorfismo -2572 C>T de *FPGS* ubicado en la región 5'UTR funciona como un silenciador transcripcional disminuyendo los niveles de RNAm de *FPGS* (Liu *et al.*, 2013).

Un estudio que analizó los polimorfismos *FPGS* rs1544105 -2572 C>T, *GGH* rs3758149 -401 C>T y *MTHFR* rs1801133 C>T de 91 niños con leucemia linfoblástica aguda que recibieron altas dosis de MTX por encima del umbral terapéutico (40 $\mu\text{mol/l}$), mostró una asociación entre los polimorfismos y la concentración de MTX circulante, mostrando que estos polimorfismos contribuyen a la variabilidad de la farmacocinética de MTX (Wang *et al.*, 2014).

Además, en una población hindú de 322 pacientes con AR tratados con MTX, a los que se les realizó un estudio en busca de variantes genéticas de las proteínas *GGH*, *SHMT1* y *TS* relacionadas con eventos adversos en respuesta al tratamiento con MTX. Observaron que el 29% (49 de 170) de los pacientes que presentaron eventos adversos recibían una dosis elevada de MTX. De manera particular se observó que los pacientes con genotipo *GGH* -401 TT recibían dosis más altas de MTX (≥ 15 mg/semana, $p=0.01$) y el incremento en las dosis se correlacionó con una mayor incidencia de eventos adversos ($p<0.001$) (Ghodke *et al.*, 2015). Estos antecedentes evidencian el papel de los polimorfismos en los genes de la ruta del folato en la variación interpaciente en la eficacia y toxicidad del MTX.

La farmacogenética del tratamiento con MTX en la AR es compleja y multigénica, con complejas interacciones entre genes y variabilidad entre individuos y entre poblaciones (James *et al.*, 2008). La prevalencia de la artritis reumatoide en México es de 1.6%, siendo la primera causa de atención en el Servicio de Reumatología en hospitales de segundo nivel.

El metotrexato es considerado el tratamiento antirreumático de primera línea en el tratamiento de la enfermedad, y es un fármaco clave en la mayoría de las terapias combinadas, sin embargo, los pacientes pueden presentar una respuesta interindividual variable a su uso, así como también efectos adversos o tóxicos asociada a la variabilidad genética. Los pacientes con AR originarios del sur de México han mostrado el uso de MTX a dosis tope, o su combinación con otros DMARDs, por lo tanto, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el papel de los polimorfismos en los genes *FPGS* (-2572 C/T) y *GGH* (-401 C/T y 452 C/T), a fin de identificar variantes genéticas candidatas a considerar en el tratamiento, monitoreo de la toxicidad y respuesta al tratamiento con MTX.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

Datos de la población

Se llevó a cabo un estudio de diseño transversal en el que se evaluaron las características clínicas de los pacientes, así como marcadores de toxicidad y de respuesta al tratamiento, para esta último se consideró el puntaje DAS28-ESR, que categoriza a los pacientes en remisión (<2.6), baja actividad (2.6-3.2), actividad moderada (>3.2-<5.1) y alta actividad (>5.1).

En un estudio de cohorte de 5,903 pacientes, se definió la toxicidad hepática por MTX como cualquier elevación de alanina transaminasa (ALT) o aspartato transferasa (AST) mayor de dos veces el límite superior de la normalidad (> 2LSN), ya que en biopsias obtenidas de los pacientes asociaron estos valores con cambios en la arquitectura celular hepática (Lin *et al.*, 2015). Y de acuerdo a las recomendaciones dadas por Romão al iniciar el tratamiento con MTX o al aumentar la dosis, se debe realizar pruebas ALT con o sin AST, creatinina y conteo sanguíneo completo cada 1 a 1.5 meses hasta que se alcance una dosis estable y cada 1 a 3 meses después de la última medición y suspender o disminuir la dosis de MTX ante la evidencia de una alteración hepática hasta regresar a los niveles normales (Romão *et al.*, 2013). En el caso de la toxicidad renal, May *et al.*, 2014a utilizaron los criterios del National Cancer Institute (USA) para eventos adversos (CTCAE) v4.03, en este estudio clasifican la toxicidad en grados; asignando la categoría de toxicidad grado 1 = creatinina sérica (SCr) >1.1-1.5 × límite superior de la normalidad (LSN); grado 2 = >1.5-3.0 LSN; grado 3 = >3.0-6.0 LSN; grado 4 => 6.0x LSN. Para determinar toxicidad hemática se considerarán valores alterados en las poblaciones celulares que determinen principalmente neutropenia, leucopenia y trombocitopenia (Koomdee *et al.*, 2012).

Análisis de laboratorio

Se obtuvieron por punción venosa de 6 a 10 mL de sangre periférica, de los cuales 5 mL fueron depositados en un tubo sin anticoagulante para la obtención de suero, el resto de la sangre se depositó en un tubo con EDTA, a partir de la cual se determinó la velocidad de sedimentación globular (VSG) (método de Wintrobe), una biometría

hemática para valorar la presencia de anemia, leucopenia, leucocitosis y trombocitopenia, así como también se realizó la extracción de DNA genómico a partir de mononucleares de sangre periférica mediante la técnica de Miller.

A partir del suero obtenido se realizaron las determinaciones bioquímicas y serológicas. Para determinar toxicidad por MTX se consideraron los parámetros bioquímicos de función hepática como; alanina aminotransferasa (AST o TGO), aspartato aminotransferasa (ALT o TGP), gamma glutamil transpeptidasa (GGT), fosfatasa alcalina (ALP), lactato deshidrogenasa (LDH), así como las proteínas totales, albumina y bilirrubina directa e indirecta (Sekisui Diagnostics; Lexington, Estados Unidos) y para determinar los efectos tóxicos renales se midió urea, creatinina (Sekisui Diagnostics; Lexington, Estados Unidos) y ácido úrico (ELITech Clinical Systems; Paris, Francia). Además de considerar el puntaje DAS28 para establecer respuesta al tratamiento definido por la presencia de baja actividad o remisión de la enfermedad. Los niveles de anticuerpos contra péptidos citrulinados cíclicos (anti-CCP) son considerados un parámetro de actividad y mal pronóstico clínico, por lo que fueron evaluados empleando el método de ELISA tipo sándwich (Axis-Shield; Dundee, Escocia).

Durante la evaluación clínica de los pacientes, se interrogó sobre la frecuencia de la ocurrencia de algunos síntomas considerados eventos adversos del consumo del MTX, entre ellos la presencia de náuseas, dolor abdominal, diarrea, vómito, dolor de cabeza, debilidad, resequedad y caída de cabello.

Identificación de los polimorfismos por PCR-RFLP

La identificación de los polimorfismos en los genes de *FPGS* y *GGH* se realizó mediante el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa y Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción, del inglés PCR-RFLP; *Polimerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism*, utilizando las condiciones descritas en el Cuadro 1., Los productos de PCR y de digestión fueron observados en geles de poliacrilamida teñidos con nitrato de plata (Cuadro 2).

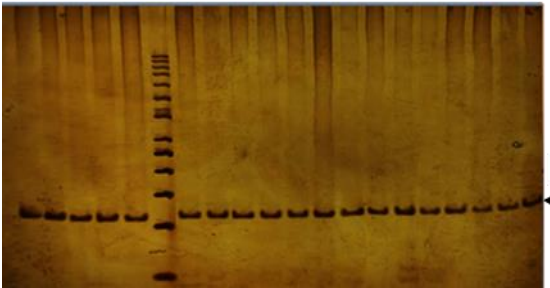
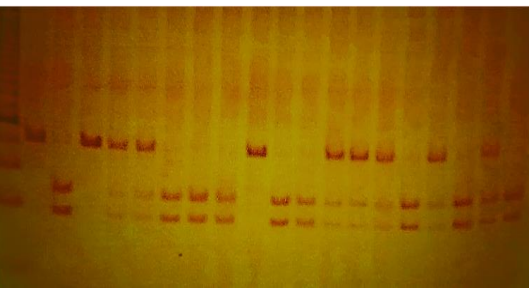
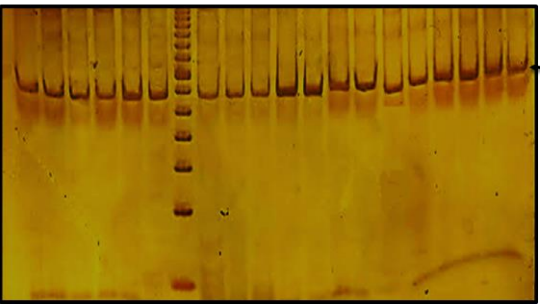
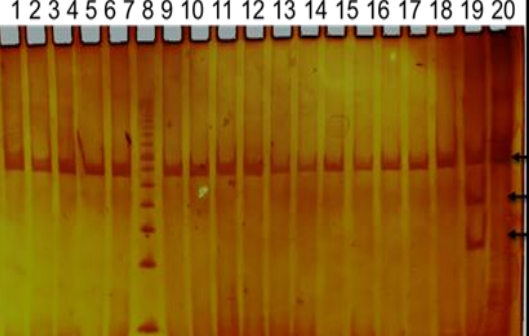
Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando los programas estadísticos STATA v.13.0, SHEsis y GraphPad Prims. Se determinaron las frecuencias absolutas y relativas para las variables cualitativas y los genotipos de los polimorfismos de *FGPS* y *GGH*, comparándolas entre grupos mediante la prueba de X^2 . Para las variables cuantitativas se determinaron medidas de tendencia central para variables no paramétricas. Los haplotipos entre ambos loci del gen *GGH* fueron inferidos utilizando el software en su versión online. Para determinar la relación y asociación entre los parámetros de toxicidad y eventos adversos se realizaron modelos de regresión logística. Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Cuadro 1. Características de los iniciadores y condiciones de PCR-RFLP utilizados para el estudio de los polimorfismos en los genes de *GGH* y *FPGS* en pacientes con artritis reumatoide.

Polimorfismo	Iniciadores sentido y antisentido	Condiciones de PCR-RFLP	Enzima	Pares base (pb) PPCR y genotipos
-401 C/T <i>GGH</i>	F5'-CGCTGCCTGGTTACCAAAC-3' R5'-TGTTACGTCGATGTGGACTTCAG-3'	20 µL: 1X buffer, 1.2 mM MgCl ₂ , 0.4 nM dNTP, 0.4 mM de cada oligonucleótido, 0.02 U/µL de Taq polimerasa y 1.5 µg de DNA genómico. Las condiciones utilizadas fueron: 1 ciclo a 95°C por 5 min; 40 ciclos a 94°C por 15 s, 60°C por 45 s y 72°C por 45 s; 1 ciclo a 72°C por 10 min.	<i>BsII</i>	PPCR (109 pb) CC:61 y 48 pb CT:109, 61 y 48 pb TT:109 pb
452 C/T <i>GGH</i>	F5'-GTGCCTATTTGGTTATGACA-3' R5'-CTACTTACTAATCCTGCCCA-3'	20 µL: 1X buffer, 1.2 mM MgCl ₂ , 0.4 nM dNTP, 0.4 mM de cada oligonucleótido, 0.02 U/µL de Taq polimerasa y 1.5 µg de DNA genómico. Las condiciones utilizadas fueron: 1 ciclo a 95°C por 5 min; 40 ciclos a 94°C por 15s, 55°C por 45s, 72°C por 45s; 1 ciclo a 72°C por 10 min.	<i>AseI</i>	PPCR (286 pb) CC:286 pb CT:286, 177 y 109 pb TT:177 y 109 pb
-2572 C/T <i>FPGS</i>	F5'-CCCAGAGTCCTTATTCTTAGCC-3' R5'-GTGCCTCCTTCACACACAG 3'	20 µL: 1X buffer, 1.2 mM MgCl ₂ , 0.4 nM dNTP, 0.4 mM de cada oligonucleótido, 0.02 U/µL de Taq polimerasa y 1.5 µg de DNA genómico. Las condiciones utilizadas fueron: 1 ciclo a 95°C por 10 min; 40 ciclos a 95°C por 15 s, 60°C por 1 min y 72°C por 1 min; y 72°C por 7 min.	<i>HpyCH4IV</i>	PPCR (298 pb) CC:298 pb CT:298, 168 y 130 pb TT:168 y 130 pb

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa, **PPCR:** Producto de PCR. **RFLP:** Fragmentos de restricción de longitud polimórfica, **pb:** pares base.

Polimorfismo	Imagen de PCR	Imagen de RFLP
-401 C/T GGH	 <p>1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20</p> <p>109 pb</p> <p>3A)</p>	 <p>1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20</p> <p>109pb 61pb 48pb</p> <p>3B)</p>
452 C/T GGH	 <p>1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20</p> <p>286pb</p> <p>3C)</p>	 <p>1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20</p> <p>286pb 177pb 109pb</p> <p>3D)</p>

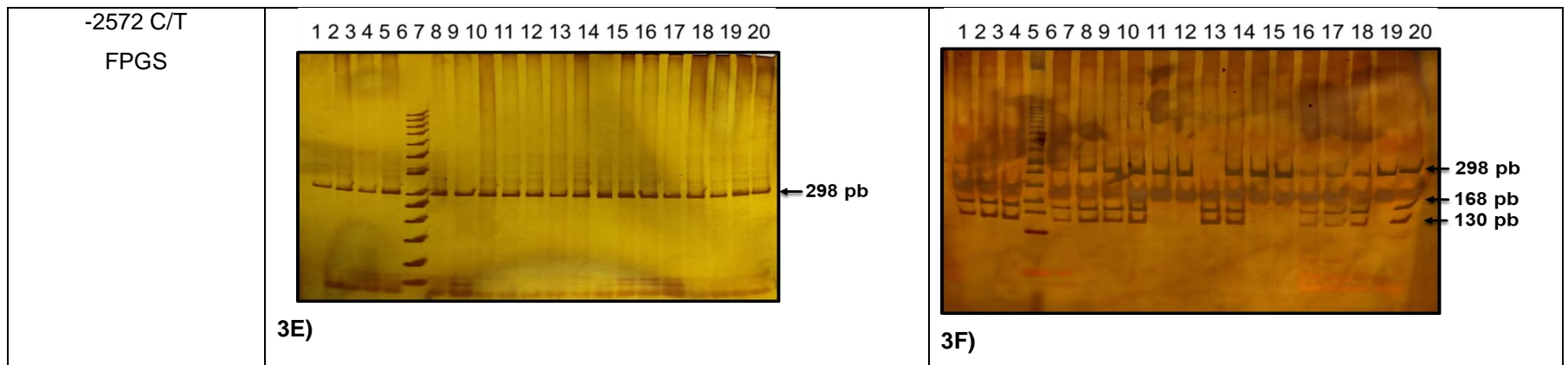


Figura 3. Determinación genotípica de los polimorfismos de *GGH* y *FPGS* por PCR-RFLP revelados en geles de poliacrilamida al 6% para PCR y 7% para RFLP. **Panel A)** PCR de -401CT *GGH* producto de 109 pb. **Panel B)** RFLP de -401CT carril 2 genotipo TT: 109 pb, carril 3 genotipo CC:61 y 48 pb, carril 5 genotipo CT:109, 61 y 48 pb. **Panel C)** PCR de 452CT *GGH* producto de 286pb. **Panel D)** RFLP de 452CT carril 1 genotipo CC 286 pb, carril 19 genotipo CT:286, 177 y 109 pb, no se encontró el genotipo TT:177 y 109 pb. **Panel E)** PCR de -2572 CT de *FPGS* producto de 298 pb. **Panel F)** RFLP de -2572CT carril 1 genotipo CC:298 pb, carril 5 genotipo CT:298, 168 y 130 pb, carril 6 genotipo TT:168 y 130 pb.

V. RESULTADOS

En el presente estudio se incluyeron 159 pacientes, en su mayoría mujeres (92.4%), diagnosticados con artritis reumatoide y atendidos en el servicio de Reumatología y Medicina Interna del Hospital General "Dr. Raymundo Abarca Alarcón". La edad promedio de los pacientes fue de 46 años (24-70). El tiempo promedio de evolución de la enfermedad fue de 8 años. Un alto porcentaje de los pacientes fue positivo a los autoanticuerpos FR y anti-CCP (80% y 88.1% respectivamente), y alrededor de un cuarto de la población analizada, presentó un puntaje DAS28 representativo de una alta actividad clínica. Con respecto al tratamiento, todos los pacientes contaban con prescripción médica de MTX, ya sea en monoterapia o en combinación con otros DMARDs. La dosis semanal de MTX, prescrita en el total de la población fue cercana a la dosis tope recomendada (25 mg) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Características sociodemográficas, clínicas y de tratamiento en AR.

	Total (n=159)
Género	
Masculino, n (%)	12 (7.6)
Femenino, n (%)	147 (92.4)
Edad, años	46 (24-70)
Consumo alcohol, n (%)	4 (2.5)
Hábito tabáquico, n (%)	4 (2.5)
Tiempo de evolución de la enfermedad (años)	8 (2-29)
VSG, mm/hr	29 (9-55)
Factor reumatoide positivo (>20 UI/mL), n (%)	128 (80)
anti-CCP positivo (>5 U/mL), n (%)	141 (88.1)
Puntaje DAS28, n (%)	
<2.6 unidades, Remisión clínica	37 (23.3)
>2.6-<3.2 unidades, Actividad clínica baja	49 (30.8)
>3.2-<5.1 unidades, Actividad clínica moderada	46 (29)
>5.1 unidades, Actividad clínica alta	25 (15.8)
Tratamiento	
MTX, n(%)	160 (95)
Tiempo promedio de TX, años	1.84
Dosis acumulada MTX, mg	1720 (480-3740)
Dosis promedio MTX, mg	24 (8.9-27.5)

anti-CCP: anticuerpos anti péptidos cíclico citrulinados, **TX:** Tratamiento, **MTX:** Metotrexato **DAS28:** Puntuación de actividad de la enfermedad (28 articulaciones). Pruebas estadísticas, Los datos mostrados representan proporciones y para variables cuantitativas se muestran medianas y (Percentiles 5 y 95).

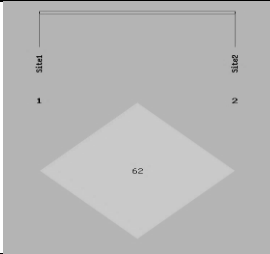
En la evaluación de los parámetros hematológicos, renales y hepáticos. El 32% de los pacientes se identificó con anemia, 99.25% con niveles por arriba del valor normal de ALP y 24.53% con niveles de GGT. La alteración en los niveles de urea fue la menos frecuente, pero representó más del 10% de los pacientes. Por otra parte, el interrogatorio sobre la presencia de eventos adversos relacionados con el consumo del MTX, reportó la presencia de náuseas (37.74%), como el evento más común, seguido del dolor de cabeza y la caída del cabello, que en general pueden clasificarse como gastrointestinales, neurológicos y mucocutáneos. Los marcadores de inflamación y niveles de autoanticuerpos permitieron generar la categoría de pacientes con respuesta al tratamiento (respondedores) o no respondedores, clasificando a aquellos con puntaje de DAS28 menor a 3.2, como respondedores, así como a aquellos con marcadores de inflamación disminuidos, de acuerdo a ello, más de la mitad de la población analizada se clasificó como respondedor, excepto por la clasificación de la VSG y hsCRP, que definieron mayor proporción de no respondedores (Cuadro 3).

Cuadro 3. Clasificación de los pacientes de acuerdo a los parámetros de inflamación y serológicos, así como por la presencia de toxicidad y efectos adversos en pacientes con AR tratados con metotrexato

<i>n</i> =159		Respuesta al tratamiento		Parámetros bioquímicos de toxicidad	
Parámetros	Respondedor	No respondedor	Parámetros	Con/presente	Sin/ausente
DAS28*	86 (54.78)	71 (45.22)	TGO *	20 (12.66)	138 (87.34)
Anti-CCP*	72 (52.17)	66 (47.83)	TGP *	8 (5.03)	151 (94.97)
Factor reumatoide (FR)*	70 (54.69)	58 (45.31)	ALP *	133 (99.25)	1 (0.75)
Leucocitos*	83 (56.85)	63 (43.15)	GGT*	39 (24.53)	120 (75.47)
VSG*-	33 (47.83)	36 (52.17)	Urea *	18 (11.32)	142 (88.68)
hsCRP*	21 (38.18)	34 (61.82)	Creatinina *	5 (3.14)	154 (96.86)
-	-	-	Anemia *	32 (20.13)	127 (79.87)
-	-	-	Leucopenia*	1 (0.63)	158 (99.37)
Eventos adversos y tóxico					
-	-	-	Vómito	25 (15.72)	134 (84.28)
-	-	-	Nauseas	60 (37.74)	99 (62.26)
-	-	-	Dolor abdominal	59 (37.11)	100 (62.89)
-	-	-	Debilidad	71 (44.65)	88 (55.35)
-	-	-	Resequedad	55 (23.9)	175 (76.08)
-	-	-	Dolor de cabeza	59 (37.11)	100 (62.89)
-	-	-	Ulceras orales	14 (8.81)	145 (91.19)
-	-	-	Caída de cabello	59 (37.11)	101 (62.89)

DAS28 <3.2, respondedor (actividad en remisión y baja), >3.2 no respondedor, *alterada, **TGO**>35 Mu/L, **TGP**>35 Mu/L, **ALP**>35 Mu/L, **GGT**>41 Mu/L. **Urea** 40mg/dL, **Creatinina** 1.1 mg/dL, **Anemia** hb<11g/L, **Leucopenia** <4.5(10⁹/L), **Leucocitosis** >11.5(10⁹/L), No respondedor; **Anti-CCP** >5UI/mL, **FR** >20UI/mL, **VSG** >30mm/h, **CRP** >10g/dL. Proporción de pacientes con presencia de eventos adversos.

El análisis de los polimorfismos en el gen *GGH*, demostró mayor frecuencia de portadores homocigotos silvestres, seguido de los individuos heterocigotos. Como consecuencia, en la construcción de haplotipos, el haplotipo predominante fue el CC, seguido del TC, y su valor D' permite sugerir un desequilibrio de ligamiento moderado, que indica una posibilidad cercana a la de segregación independiente de alelos. En el caso del polimorfismo *FPGS* -2572 C/T el genotipo predominante fue el heterocigoto (54.09%), seguido del genotipo silvestre (Cuadro 4).

Cuadro 4. Frecuencia genotípica de los polimorfismos <i>FPGS</i> y <i>GGH</i> en pacientes con AR				
Polimorfismo	Genotipo n=159 (%)	Alelos	n (%)	Localización
<i>GGH</i> -401 C/T (rs3758149)				5'UTR
CC	82 (51.57)	C	215 (67.61)	
CT	51 (32.08)	T	103 (32.39)	
TT	26 (16.35)			
<i>GGH</i> 452 C/T (rs11545078)				Exón
CC	154 (96.86)	C	313 (98.42)	
CT	5 (3.14)	T	5 (1.58)	
TT				
Haplotipos SNPs <i>GGH</i>	Frecuencia		D', r^2	
CC	0.675		0.625, 0.013	
CT	0.004			
TC	0.309			
TT	0.012			
<i>FPGS</i> -2572 C>T (rs1544105)				5'UTR
CC	43 (27.04)	C	172 (54.08)	
CT	86 (54.09)	T	146 (45.92)	
TT	30 (18.87)			

Los datos mostrados representan n (proporciones)

En la figura 4, se esquematiza la dosis de MTX prescrita semanalmente, en relación con los genotipos de los polimorfismos analizados. Se observa que los portadores de los genotipos silvestres reciben mayores dosis de MTX, aunque sólo de manera significativa en aquellos portadores del genotipo CC del polimorfismo -401 C/T (Figura 3). Se observó que los pacientes portadores del alelo silvestre C del polimorfismo -401 C/T de *GGH* presentaron una dosis promedio mayor de MTX 25 mg/semana en comparación con los portadores del alelo T 20 mg/semana, de manera similar al evaluar la dosis promedio en función del genotipo presentado por los pacientes del polimorfismo 452 C/T *GGH* se observó que los pacientes portadores del alelo C recibieron dosis mayores de MTX a comparación de los portadores del alelo T 24.09 mg/semana y 15 mg/semana respectivamente, esta tendencia también se observa en los pacientes evaluados con el polimorfismo 2572 C/T de *FPGS* los portadores del alelo C recibieron 25 mg/semana y los portadores del alelo T 23.33 mg/semana (Figura 9).

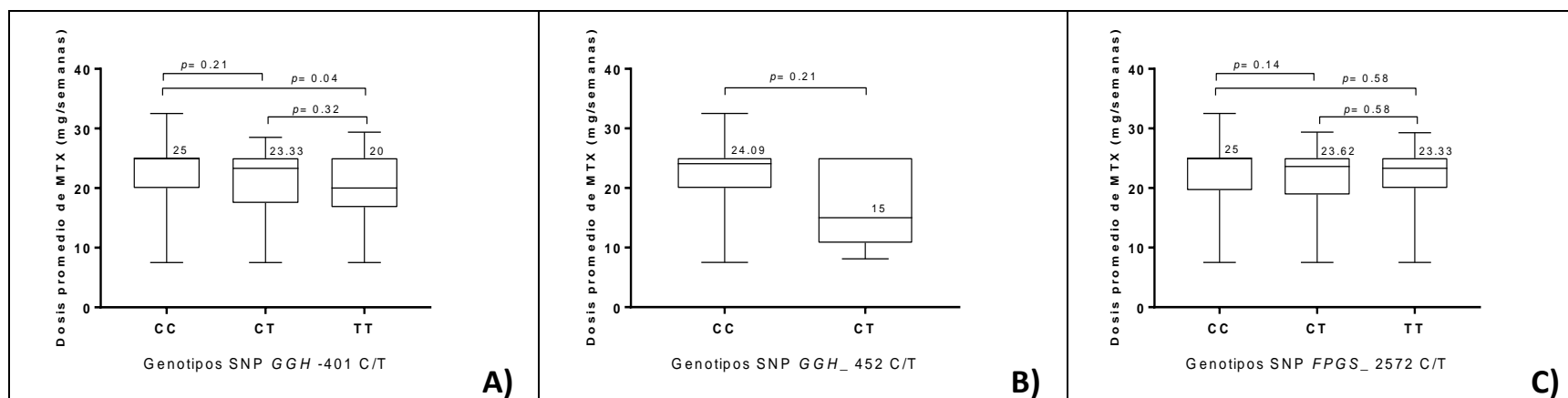


Figura 4. Dosis promedio de MTX en pacientes con AR. PANEL A) Dosis promedio de MTX en pacientes con el polimorfismo *GGH* -401 C/T. **PANEL B)** Dosis promedio de MTX en pacientes con el polimorfismo *GGH* 452 C/T. **PANEL C)** Dosis promedio de MTX en pacientes con el polimorfismo *FPGS* -2572 C/T.

Para analizar la relación farmacogenética con los parámetros de toxicidad, respuesta al tratamiento y/o eventos adversos, se realizaron modelos de regresión lineal. Los pacientes portadores del alelo T del polimorfismo de *GGH* -401C/T, evidenciaron mayor susceptibilidad para presentar parámetros que podrían referir toxicidad hepática (niveles de GGT y TGO por arriba de lo normal), mayor susceptibilidad de anemia, y urea alterada, así como con una menor respuesta al tratamiento determinada por niveles de DAS28, pero no para presentar eventos adversos (Figura 5).

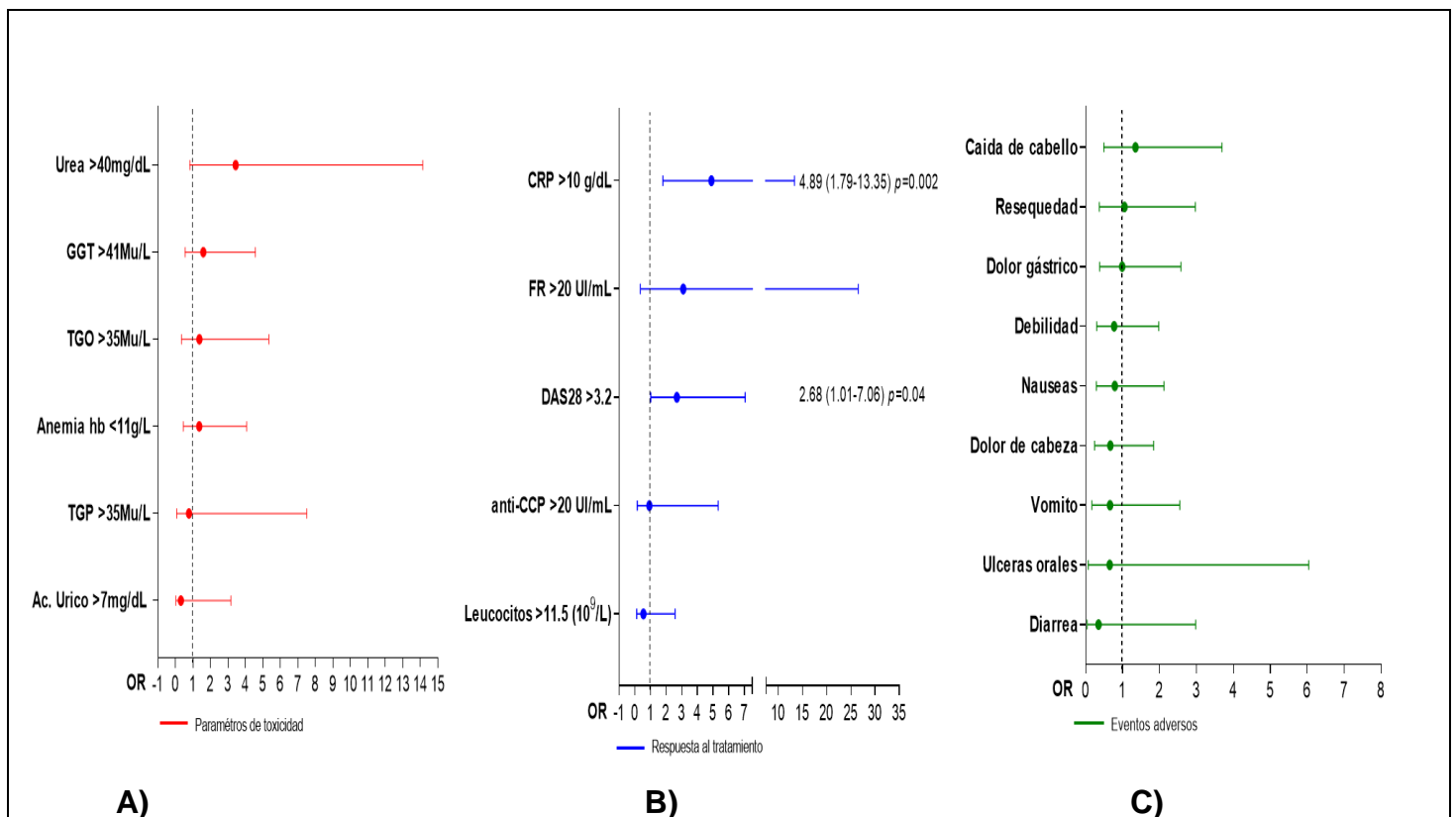


Figura 5. Asociación del polimorfismo GGH -401C/T con parámetros de toxicidad, no respuesta al tratamiento y eventos adversos. ALP: Panel A) Marcadores de toxicidad Panel B) Marcadores de actividad clínica Panel C) Eventos adversos. Fosfatasa alcalina, TGP: Alanina-aminotransferasa TGO: Transaminasa Glutámico Oxalacética, GGT: Gama glutamil-transpeptidasa, FR: Factor reumatoide, anti-CCP: Anticuerpos anti péptido cíclico citrulinado. *CC Categoría de referencia. -Módulo de regresión logística ajustado por: edad, años de evolución de la enfermedad, consumo de corticoides y consumo de NSAID.

La susceptibilidad genética determinada por el alelo T del polimorfismo de *GGH* 452C/T, para presentar marcadores relacionados con toxicidad hepática (TGP y TGO) fue positiva (Figura 6), sin embargo, es importante considerar que la frecuencia alélica identificada en esta población fue baja.

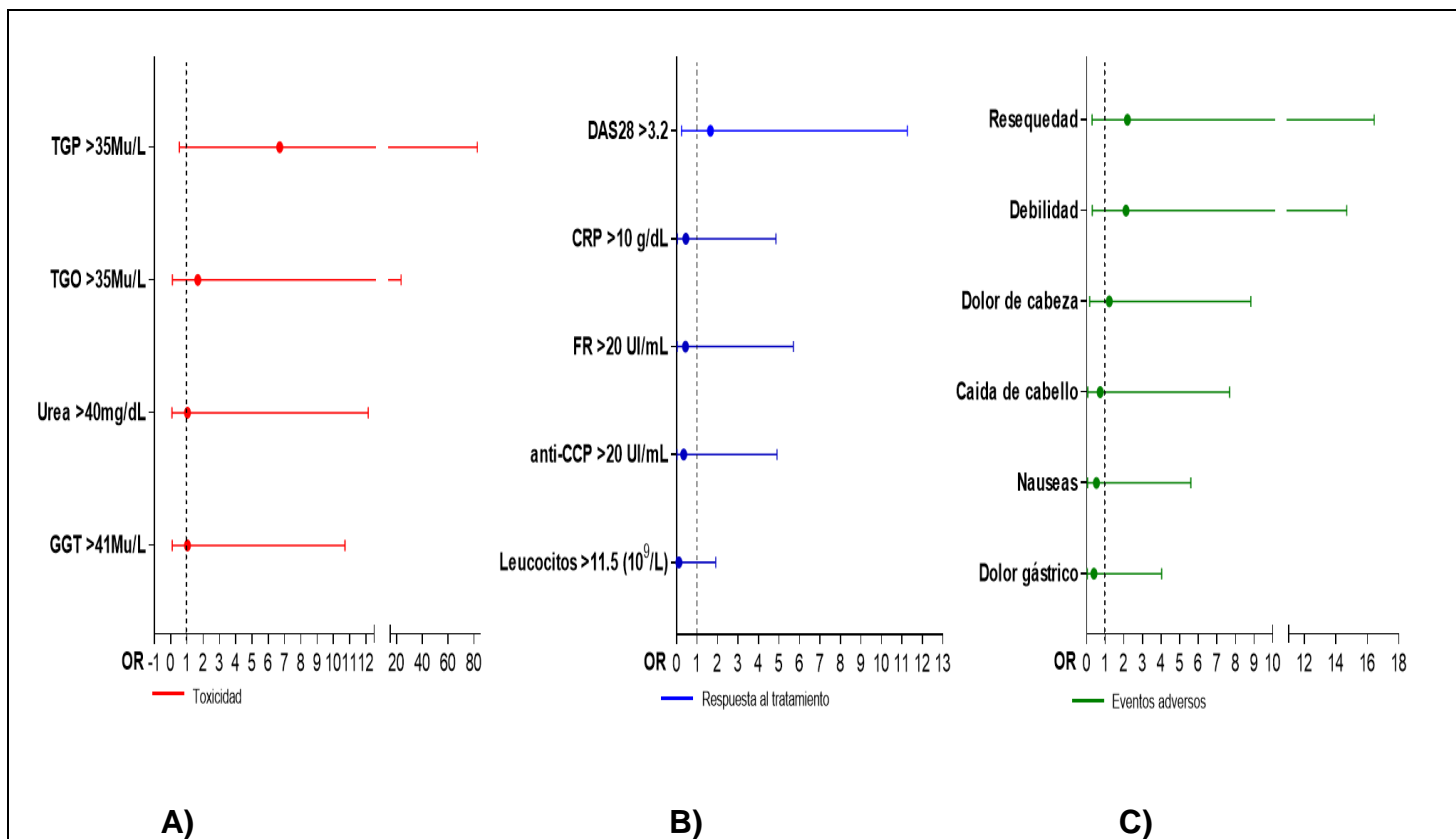


Figura 6. Asociación del polimorfismo GGH 452 C/T con parámetros de toxicidad, no respuesta al tratamiento y eventos adversos. Panel A) Marcadores de toxicidad Panel B) Marcadores de actividad clínica Panel C) Eventos adversos. ALP: Fosfatasa alcalina, TGP: Alanina-aminotransferasa TGO: Transaminasa Glutámico Oxalacética, GGT: Gama glutamil-transpeptidasa, FR: Factor reumatoide, anti-CCP: Anticuerpos anti péptido cíclico citrulinado. *CC Categoría de referencia. -Módulo de regresión logística ajustado por: edad, años de evolución de la enfermedad, consumo de corticoides y consumo de NSAID.

Al realizar el análisis por haplotipos, se encontró que los pacientes portadores del haplotipo TC tienen una mayor susceptibilidad de presentar pobre respuesta al tratamiento, así como niveles elevados de Urea, TGO, GGT y anemia, que son marcadores toxicidad renal y hepática, además de presentar susceptibilidad para presentar un evento adverso importante como lo son las úlceras orales, a pesar de recibir dosis de MTX estándares (Figura 7).

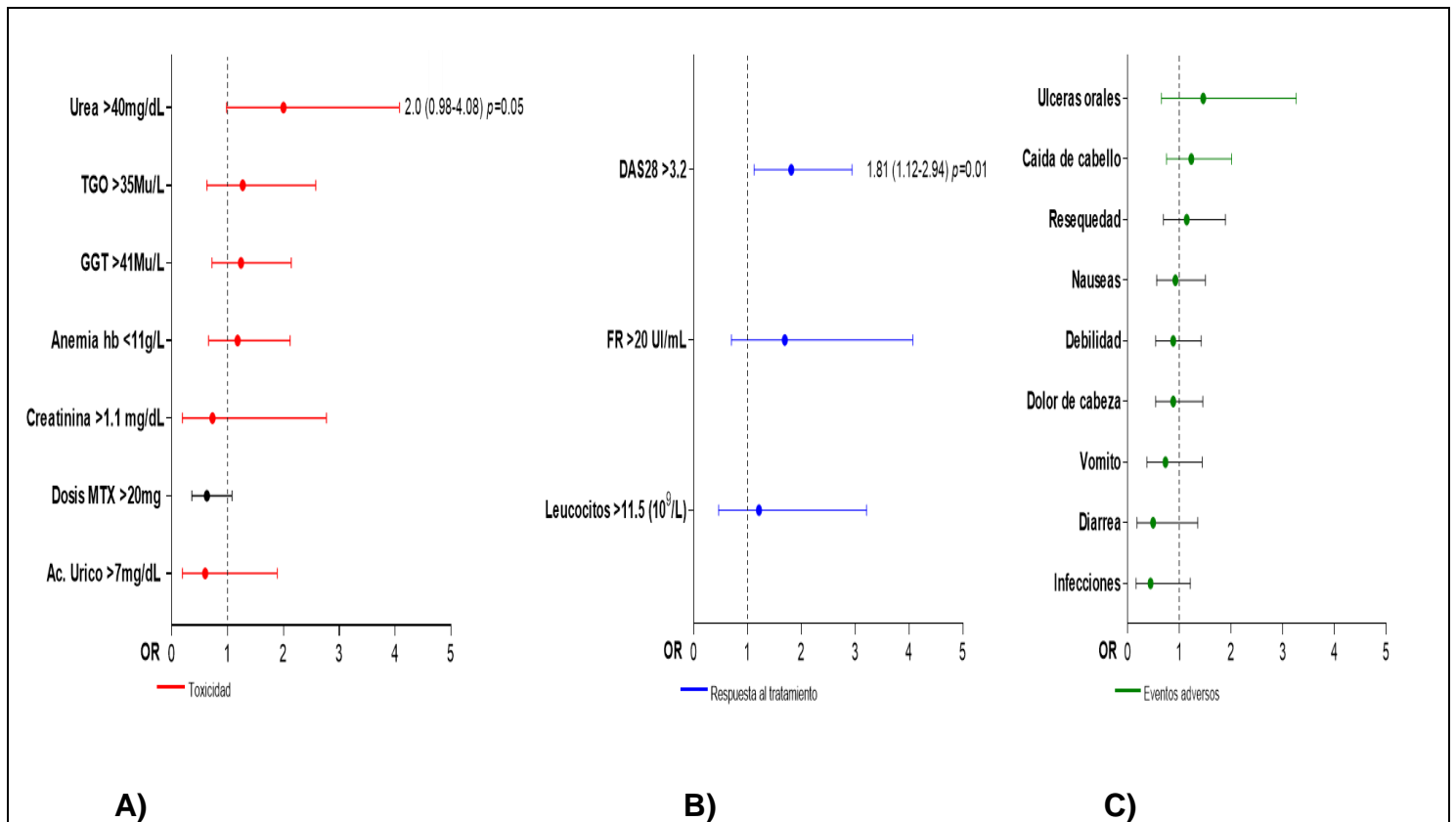


Figura 7. Asociación del haplotipo TC con parámetros de toxicidad, no respuesta al tratamiento y eventos adversos. Panel A) Marcadores de toxicidad Panel B) Marcadores de actividad clínica Panel C) Eventos adversos. ALP: Fosfatasa alcalina, TGP: Alanina-aminotransferasa TGO: Transaminasa Glutámico Oxalacética, GGT: Gama glutamil-transpeptidasa, FR: Factor reumatoide, anti-CCP: Anticuerpos anti péptido cíclico citrulinado.

A pesar de la baja frecuencia del haplotipo TT, pudo determinarse su relación con la susceptibilidad a presentar marcadores de toxicidad hepática, particularmente con niveles por arriba del valor normal para TGO y TGP, y con la protección de prescripción de MTX a dosis tope (Figura 8).

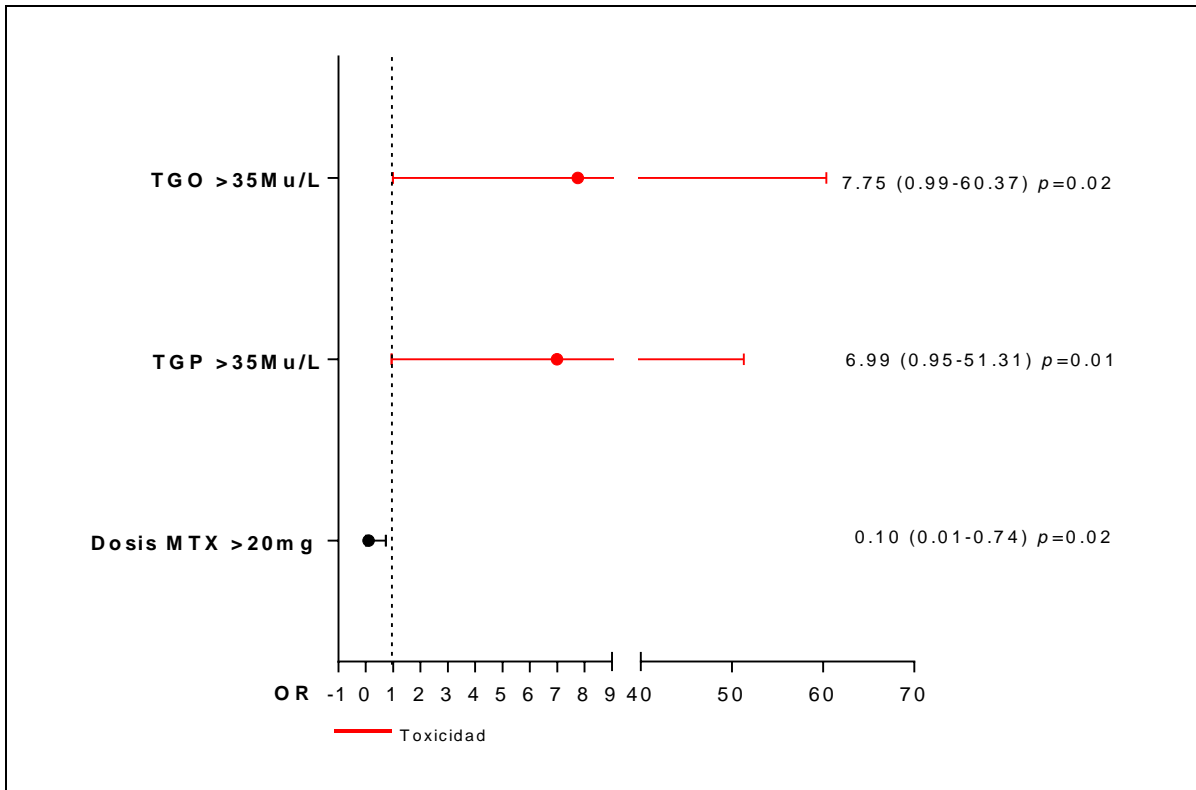


Figura 8. Asociación del haplotipo TT con parámetros de toxicidad. TGP: Alanina-aminotransferasa
TGO: Transaminasa Glutámico Oxalacética.

Por último, los portadores del alelo T para el polimorfismo *FPGS* -2572 C/T mostraron susceptibilidad para presentar anemia y úlceras orales (Figura 9), sin embargo, aunque la asociación fue positiva éstas no alcanzaron la significancia estadística.

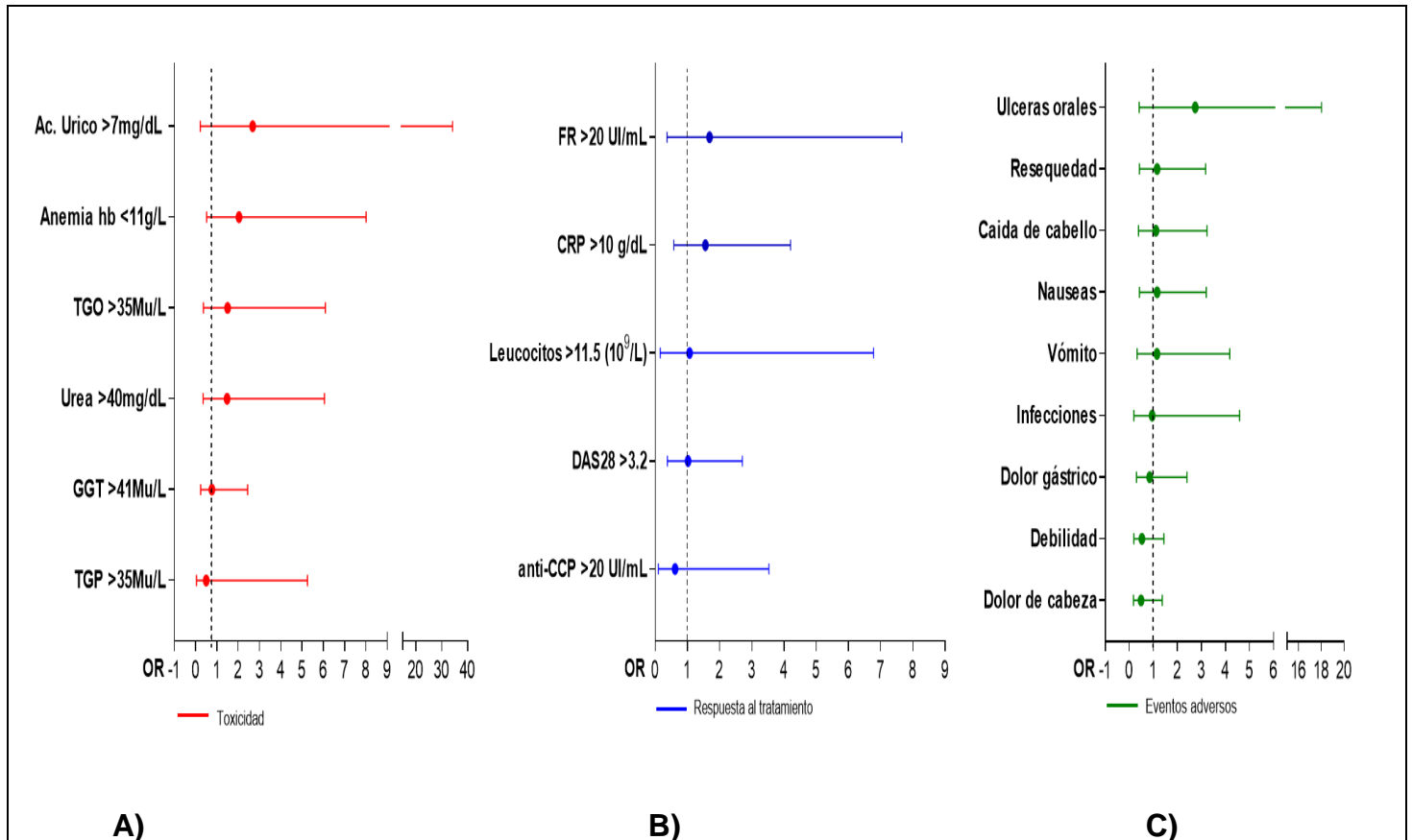


Figura 9. Asociación del polimorfismo *FPGS* -2572 C/T con parámetros de toxicidad, respuesta al tratamiento y eventos adversos. Panel A) Marcadores de toxicidad Panel B) Marcadores de actividad clínica Panel C) Eventos adversos. ALP: Fosfatasa alcalina, TGP: Alanina-aminotransferasa TGO: Transaminasa Glutámico Oxalacética, GGT: Gama glutamil-transpeptidasa, FR: Factor reumatoide, anti-CCP: Anticuerpos anti péptido cíclico citrulinado. *CC Categoría de referencia. -Módulo de regresión logística ajustado por: edad, años de evolución de la enfermedad, consumo de corticoides y consumo de NSAID.

VI. DISCUSIÓN

Los pacientes diagnosticados con AR son monitoreados a través de diferentes herramientas con el fin de determinar el estado de salud del paciente, la actividad clínica de la enfermedad y la respuesta al tratamiento. El DAS28 es una herramienta útil para valorar la actividad clínica de la enfermedad y la respuesta farmacológica de los pacientes (Van Riel y Renskers, 2014). Los pacientes con AR son tratados de acuerdo al esquema sugerido por la EULAR en el cual el principal fármaco para el tratamiento es MTX, en este estudio se determinó que los pacientes utilizan dosis cercanas a la dosis tope recomendada, y una dosis acumulada elevada, aun cuando el tiempo promedio de tratamiento es de 1.8 años. La importancia de la dosis de MTX radica en que se ha observado que el MTX tiene un efecto acumulativo en los órganos blanco del fármaco ya que cuando hay un incremento de MTX intracelular existe la posibilidad de que aumenten las cadenas de glutamato más largas y esto a su vez tiene un efecto en la vida media del MTX, si las cadenas son más largas, el tiempo de vida medio de las moléculas se incrementa y tiene efecto en el potencial citotóxico del MTX (Yamamoto *et al*, 2016).

Se ha reportado que la exposición crónica a MTX tiene como consecuencia la toxicidad en un importante número de pacientes y se determina a partir de alteración en los parámetros clínicos, hepáticos, hematológicos y renales de los pacientes. En este estudio se observó que los pacientes presentan parámetros clínicos alterados de los marcadores hepáticos, la enzima ALP se encontró alterada en el 99.25% de los pacientes, de acuerdo con Kojima *et al.*, 2002 describen que ALP se ha asociado con la actividad de la enfermedad en AR, ya que encontró que los niveles de ALP se correlaciona directamente con los niveles de CRP (Uno de los principales marcadores de inflamación y actividad clínica de AR), a nivel hematológico se observó que el 20.13% de los pacientes presentaron anemia, que podría relacionarse al proceso de reducción de la biodisponibilidad de hierro y/o disminución de la forma eritroide en medula ósea consecuencia de la supresión de la medula por MTX (García, *et al.*, 2013). Kim *et al.*, 2012 describen eventos de toxicidad inducida por fármacos principalmente a nivel renal, en este estudio se observó que la urea fue uno de los parámetros alterados en mayor frecuencia (11.32%), pero no asociada con la

presencia de las variantes genéticas en estudio y es que el paciente con AR se encuentra bajo tratamiento combinado con cloroquina, leflunomida o sulfalazina, por lo que la alteración renal puede ser consecuencia del efecto sinérgico del metabolismo de múltiples fármacos.

Además, la presencia de parámetros alterados asociados con la administración de fármacos como MTX, se relaciona con la aparición de eventos adversos de tipo gastrointestinal, mucocutáneos y neuronales, eventos que se presentaron en una proporción importante de nuestros pacientes. Se ha descrito los eventos gástricos son los mayormente presentados por pacientes con AR (Wang *et al.*, 2018) esto debido a la vía de administración oral del MTX, sin embargo Albaqami *et al.*, 2019 refieren que una de las principales causas de abandono o falta de disposición para el cumplimiento de la terapia es la presencia de eventos adversos gástricos. Ajmani *et al.*, 2017 reportaron la alteración de parámetros hematológicos y la presencia de eventos adversos por ejemplo mucositis oral, fiebre, diarrea entre otros, asociados con el tratamiento con MTX.

Los pacientes con AR tienden a presentar una respuesta farmacológica interindividual al tratamiento con MTX, dado que ésta es determinada por variables relacionadas con la dosis administrada, la edad, la condición clínica y física del paciente, pero también relacionado con variantes genéticas relacionadas a genes involucrados en el metabolismo de los fármacos, por lo que el fracaso al tratamiento se ha asociado con polimorfismos en la ruta metabólica del MTX (Soukup *et al.*, 2018),o con un pobre respuesta clínica, así como toxicidad al no poder metabolizarlos de manera adecuada (Restrepo *et al.*, 2016).

Como se mencionó anteriormente la dosis juega un rol importante en la toxicidad aunado con la probabilidad de que los pacientes presenten polimorfismos en los genes encargados de codificar las enzimas implicadas en el metabolismo del MTX, (Schiff y Sadowski, 2017) y el posible desarrollo de toxicidad (Dervieux *et al.*, 2010) caracterizados por alteración de diversos parámetros bioquímicos y la presencia de eventos adversos al medicamento (Ajmani *et al.*, 2017).

En México Organista *et al.*, 2013 determinó en un grupo de pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) tratados con MTX la asociación de los polimorfismos -401 C/T y 452C/T en el gen *GGH* con las frecuencias genotípicas fueron similares a las reportadas en los pacientes con AR del presente estudio, dada la proximidad genética de las poblaciones de estudio.

Spooner *et al.*, 1982 reportaron un incremento de la enzima TGO en pacientes tratados con MTX, sin embargo, no evaluaron su relación con la presencia de algunos polimorfismos. En este estudio se observó que de los marcadores de respuesta al tratamiento se observó que los pacientes portadores del alelo T tienen un riesgo mayor de presentar niveles elevados de CRP (4.89), FR (OR=3.09) y DAS28 (OR=2.68), para los eventos adversos se observó que para los portadores del alelo T presentaron un mayor riesgo de presentar eventos adversos como caída de cabello y resequedad.

La diferencia en la dosis administrada en los pacientes puede ser explicada por el efecto de los polimorfismos sobre la capacidad del paciente para expulsar o retener el MTX en las células, a partir de esto se han desarrollado metodologías que permiten comprobar a través de ensayos funcionales el efecto de los polimorfismos de acuerdo a su localización y el efecto que tiene en la enzima, relevante a esto un estudio realizado por Chave *et al.*, 2003 realizaron transfecciones en líneas celulares hepáticas y de cáncer de mama con segmentos del gen de *GGH* en donde se ubican los polimorfismos -401 C/T y 452 C/T y de manera funcional a través de ensayos de luciferasa comprobaron que el polimorfismo -401 C/T al estar en la región promotora del gen tiene como resultado un aumento de 2 veces en la transcripción de la enzima *GGH*, lo que conlleva un incremento en la traducción y a su vez un incremento en la transcripción de *GGH*, explicando por qué los pacientes podrían requerir menores dosis de MTX cuando presentan la forma alélica C que presentan una transcripción y traducción menor en comparación de cuando se presenta el alelo T, favoreciendo una cantidad de enzimas menor que a su vez implica a una disminución en la remoción de residuos de glutamato, lo que confiere a los metabolitos un mayor tiempo dentro de las células, observándose en los

pacientes como una pobre respuesta a la terapia e incremento de marcadores de toxicidad esto en cuanto al polimorfismo -401 C/T, el polimorfismo 452 C/T se encuentra ubicado en la región codificante de la enzima específicamente en el exón 6 que codifica para región catalítica de la enzima cuando existe el polimorfismo da lugar a un cambio en el aminoácido que codifica, pasando de una treonina a isoleucina que sería un cambio de un aminoácido hidrofílico a uno hidrofóbico, este cambio se ha descrito que reduce la capacidad catalítica de la enzima lo que se ha demostrado que tiene como consecuencia que los pacientes lleguen a presentar toxicidad o la aparición de eventos adversos, sin embargo en un estudio realizado por Jonasson *et al.*, 2002 al transfectar el gen de la enzima con la variante polimórfica en cepas de *E. coli* y comparando con la enzima silvestre encontraron que no hay una diferencia entre la actividad catalítica de ambas enzimas, no obstante Chave *et al.*, 2003 describen que las asociaciones observadas hasta el momento podrían ser consecuencia de la falta de glicosilación, consecuencia de la modificación de aminoácidos generado por el polimorfismo al no presentar la glicosilación podría afectar la localización intracelular de la enzima impidiendo su función.

Al evaluar el polimorfismo 452C/T de *GGH* se observó que la presencia del alelo T incrementa el riesgo de presentar niveles elevados en parámetros de toxicidad TGP (OR=6.70), TGO (OR=1.67) y de actividad clínica asociada a la pobre respuesta al tratamiento (DAS28 OR=1.65) y eventos adversos como resequeidad (OR=2.19) y debilidad (OR=2.11). Sin embargo, no se encontró una asociación estadísticamente significativa esto probablemente debido a la baja frecuencia de portadores del alelo T, aunado al hecho de que los pacientes recibían dosis diferentes de MTX, a pesar de lo anterior se puede observar que la presencia de este polimorfismo tiene una influencia sobre la toxicidad y respuesta al tratamiento.

Posteriormente se realizó la construcción de haplotipos con la combinación de alelos en de los polimorfismos de *GGH*, con el fin de determinar que combinación alélica se asociaba con marcadores de toxicidad, respuesta al tratamiento y la presencia de eventos adversos encontrando que la combinación de alelos TC fueron los que se

asociaron con un mayor riesgo de presentar mayores niveles de marcadores de toxicidad como: urea (OR=2.0), GGT (OR=1.24), pobre respuesta al tratamiento: DAS28 (OR=1.81 $p=0.01$) lo que sugiere que la combinación TC de los pacientes portadores de ambos alelos presentan un mayor riesgo de presentar puntuaciones elevadas de DAS28, lo que indicaría una falta de respuesta al tratamiento y eventos adversos del cual el evento adverso es úlceras orales (OR=1.46) fue el que presentó mayor riesgo y se podría relacionar con la vía de administración oral debido a que es la región anatómica que tiene mayor contacto con el MTX, conllevando a una citotoxicidad, además de una exposición prolongada ya que el tratamiento puede durar años dependiendo de la respuesta del paciente. Consecutivamente se realizó la asociación con el haplotipo TT y marcadores de toxicidad hepática encontrando que se asoció de manera estadísticamente significativa con TGO (OR=7.75 $p=0.02$) y TGP (OR=6.99 $p=0.01$), sin embargo, la frecuencia de esta combinación es bastante baja (1.2%) además todo lo anterior podría ser explicado por el incremento de la enzima *GGH* lo promueve la salida de MTX y la posible acumulación en hígado que es el órgano encargado del aclaramiento del MTX lo que explicaría el incremento en las enzimas hepáticas.

Para el caso del polimorfismo -2572 C/T de *FPGS* es un polimorfismo que se ha asociado con la disminución en la transcripción de *FPGS* Liu *et al.*, 2013 realizaron PCR en tiempo real para determinar el nivel de transcripción de *FPGS* en pacientes que presentaban el polimorfismo -2572 y observaron que en presencia del polimorfismo disminuyó 1.5 veces el transcrito de *FPGS*, la enzima juega un papel importante en la activación del MTX y a su vez con la permanencia del MTX dentro de las células promoviendo la citotoxicidad cuando no hay un buen equilibrio en las concentraciones enzimáticas de *FPGS*, en el estudio realizado por Liu no encontraron asociación con parámetros de toxicidad, en nuestro estudio se asoció con un riesgo de presentar niveles elevados de Ac. Úrico (OR=2.68) anemia (OR=2.04) TGO (OR=1.50), FR (OR=1.69), CRP (OR=1.56), leucocitos (OR=1.07) y presentar eventos adversos como debilidad, dolor de cabeza, caída de cabello y dolor abdominal, este efecto podría deberse a la compensación dada por la presencia de otros polimorfismos que podrían presentar las enzimas, también la dieta

o la suplementación con folato puede jugar un papel importante en la poliglutamación, ya que no solo se llevaría en el MTX, sino también las reservas de folato intracelulares competirían por la poliglutamación(Liu et al., 2013).

En la respuesta al tratamiento se ha observado que se modifica en pacientes que presentan polimorfismo el polimorfismo -401 C/T con algunas de las herramientas y predictores clínicos de respuesta al tratamiento y se observó un incremento en el riesgo de presentar niveles elevados de CRP (OR=4.89), FR (OR=3.09) y DAS28 (OR=2.68), para el polimorfismo 452C/T de *GGH* se incrementó el riesgo de presentar mayores niveles de actividad clínica DAS28 (OR=1.65) y para el caso del polimorfismo -2572 C/T de *FPGS* se asoció con un riesgo de presentar niveles mayores de FR (OR=1.69), sin embargo, se observó que los pacientes tendían a presentar mayores niveles de CRPhs, esto es importante ya que se ha observado que pacientes tratados con altos niveles de CRPhs tienen un mayor riesgo de no responder a MTX (Aramaki *et al.*, 2018).

La toxicidad farmacológica y respuesta al tratamiento con MTX en pacientes con AR, es resultado de una compleja interacción génica, modulada por la variabilidad terapéutica relacionada con la dosis y combinación farmacológica, incluso con variables de tipo ambiental. A pesar de ello, en este estudio se evidencia la importancia de la evaluación de los polimorfismos implicados en la vía del folato con relación al esquema de tratamiento, ya que de acuerdo a la literatura y a lo observado en este estudio la respuesta farmacológica se encuentra estrechamente relacionada con las variantes genéticas de las poblaciones, un esquema menos generalizado promovería una mejor respuesta al tratamiento así como una disminución en la frecuencia de eventos adversos y presencia de toxicidad farmacológica, contribuyendo a un mejor seguimiento del tratamiento por parte del paciente.

VII. CONCLUSIONES

Los pacientes portadores del alelo T del polimorfismo -401 C/T de *GGH* presentan mayores niveles de marcadores de toxicidad inducida por MTX.

Los pacientes portadores del alelo T del polimorfismo 452 C/T de *GGH*, presentan un riesgo mayor de presentar niveles elevados de TGP, TGO y marcadores de pobre respuesta al tratamiento definidos por la elevada actividad clínica (DAS28).

El haplotipo TC de los polimorfismos -401 CT y 452 CT de *GGH* se asoció con la falta respuesta al tratamiento y altos niveles de urea mientras que el haplotipo TT se asoció con toxicidad hepática a bajas concentraciones de MTX.

Los pacientes portadores del alelo T del polimorfismo -2572 C/T de *FPGS*, tienen un riesgo mayor de presentar niveles alterados de Ácido úrico y eventos adversos, principalmente gástricos y mucocutáneos.

VIII. REFERENCIAS

- Ajmani, S., Preet Singh, Y., Prasad, S., Chowdhury, A., Aggarwal, A., Lawrence, A., *et al.* (2017). Methotrexate-induced pancytopenia: a case series of 46 patients. *International Journal of Rheumatic Diseases*, 20(7), 846–851.
- Albaqami, J., Alshalhoub, R., Almalag, H., Dessougi, M., Al Harthi, A., Bedaiwi, M. K., & Omair, M. A. (2019). Prevalence of methotrexate intolerance among patients with rheumatoid arthritis using the Arabic version of the methotrexate intolerance severity score. *International Journal of Rheumatic Diseases*, 22(8), 1572–1577.
- Aramaki, T., Ueki, Y., Kojima, K., Kurushima, S., Tsuji, Y., Kawachi, N., *et al.* (2018). Clinical predictors of inadequate response to conventional synthetic disease-modifying antirheumatic drugs (csDMARDs) including methotrexate (MTX) in untreated rheumatoid arthritis patients: A single-center observational study. *Modern Rheumatology*, 1–8.
- Caratachea, M. A. C. (2007). Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. *Revista Del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 20(3), 213–221.
- Chauhan, K., & Al-Dhahir, M. A. (2019). *Arthritis, Rheumatoid. StatPearls.*
- Chave, K. J., Ryan, T. J., Chmura, S. E., & Galivan, J. (2003). Identification of single nucleotide polymorphisms in the human γ -glutamyl hydrolase gene and characterization of promoter polymorphisms. *Gene*, 319, 167–175.
- Cheung, R. L. H., Lee, C., Jones, E. J., & Riddick, D. S. (1996). Lack of effect of methotrexate on the expression of constitutive hepatic cytochromes P450 in the male rat. *Xenobiotica*, 26(5), 503–514.
- Cronstein, B. N. (2005). Low-dose methotrexate: a mainstay in the treatment of rheumatoid arthritis. *Pharmacological Reviews*, 57(2), 163–172.
- Dervieux, T., Zablocki, R., & Kremer, J. (2010). Red blood cell methotrexate polyglutamates emerge as a function of dosage intensity and route of administration during pulse methotrexate therapy in rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, 49(12), 2337–2345.
- Dorababu, P., Naushad, S. M., Linga, V. G., Gundeti, S., Nagesh, N., Kutala, V. K. *et al.* (2012). Genetic variants of thiopurine and folate metabolic pathways determine 6-MP-mediated hematological toxicity in childhood ALL. *Pharmacogenomics*, 13(9), 1001–1008.
- García-Magallón, B., Sangüesa Gómez, C., Méndez Perles, C., & Mulero Mendoza, J. (2013). Protocolo diagnóstico y terapéutico de la anemia en pacientes con artritis reumatoide. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 11(30), 1879–1883.
- Ghodke-Puranik, Y., Puranik, A. S., Shintre, P., Joshi, K., Patwardhan, B., Lamba, J., *et al.* (2015). Folate metabolic pathway single nucleotide polymorphisms: a predictive pharmacogenetic marker of methotrexate response in Indian (Asian) patients with rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics*, 16(18), 2019–2034.
- Inoue, K., & Yuasa, H. (2014). Molecular Basis for Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Methotrexate in Rheumatoid Arthritis Therapy. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 29(1), 12–19.
- Isaacs, J. D. (2010). The changing face of rheumatoid arthritis: sustained remission for all? *Nature Reviews Immunology*, 10(8), 605–611.
- James, H. M., Gillis, D., Hissaria, P., Lester, S., Somogyi, A. A., Cleland, L. G., & Proudman, S. M. (2008). Common polymorphisms in the folate pathway predict efficacy of combination regimens containing methotrexate and sulfasalazine in early rheumatoid arthritis. *Journal of Rheumatology*, 35(4), 562–571.
- Jonasson, P., Liljeqvist, S., Nygren, P.-Å., & Ståhl, S. (2002). Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 35(2), 91.

- Kim, S.-Y., & Moon, A. R. (2012). Drug-Induced Nephrotoxicity and Its Biomarkers. *Biomolecules and Therapeutics*, 20(3), 268–272.
- Kojima, H., Uemura, M., Sakurai, S., Ann, T., Ishii, Y., Imazu, H., *et al.* (2002). Clinical features of liver disturbance in rheumatoid diseases: clinicopathological study with special reference to the cause of liver disturbance. *Journal of Gastroenterology*, 37(8), 617–625.
- Koomdee, N., Hongeng, S., Apibal, S., & Pakakasama, S. (2012). Association between polymorphisms of dihydrofolate reductase and gamma glutamyl hydrolase genes and toxicity of high dose methotrexate in children with acute lymphoblastic leukemia. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP*, 13(7), 3461–3464.
- Korell, J., Duffull, S. B., Dalrymple, J. M., Drake, J., Zhang, M., Barclay, M. L., *et al.* (2014). Comparison of intracellular methotrexate kinetics in red blood cells with the kinetics in other cell types. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 77(3), 493–497.
- Lin, C., Karlson, E. W., Dligach, D., Ramirez, M. P., Miller, T. A., Mo, H., *et al.* (2015). Automatic identification of methotrexate-induced liver toxicity in patients with rheumatoid arthritis from the electronic medical record. *Journal of the American Medical Informatics Association : JAMIA*, 22(e1), e151-61.
- Liu, S.-G., Gao, C., Zhang, R.-D., Jiao, Y., Cui, L., Li, W.-J., *et al.* (2013). FPGS rs1544105 polymorphism is associated with treatment outcome in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell International*, 13(1), 107.
- May, J., Carson, K. R., Butler, S., Liu, W., Bartlett, N. L., & Wagner-Johnston, N. D. (2014a). High incidence of methotrexate associated renal toxicity in patients with lymphoma: a retrospective analysis. *Leukemia & Lymphoma*, 55(6), 1345–1349.
- May, J., Carson, K. R., Butler, S., Liu, W., Bartlett, N. L., & Wagner-Johnston, N. D. (2014b). High incidence of methotrexate associated renal toxicity in patients with lymphoma: a retrospective analysis. *Leukemia & Lymphoma*, 55(6), 1345–1349.
- Morales López, A. (2013). Artritis Reumatoide. *Revista Medica de Costa Rica y Centroamerica LXX*, (607), 523–528.
- Morrison, Paul F.; Dedrick, Robert L.; J. Lutzl, R. (1987). *Drinking Water and Health, Volume 8 Pharmacokinetics in Risk Assessment. Environmental Studies* (Vol. 8).
- Oppeneer, S. J., Ross, J. A., Koh, W.-P., Yuan, J.-M., & Robien, K. (2012). Genetic variation in folypolyglutamate synthase and gamma-glutamyl hydrolase and plasma homocysteine levels in the Singapore Chinese Health Study. *Molecular Genetics and Metabolism*, 105(1), 73–78.
- Organista-Nava, J., Gomez-Gomez, Y., Illades-Aguilar, B., & Leyva-Vázquez, M. A. (2013). Survival of Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia, 1–28.
- Restrepo, L. F., Giraldo, R., Londoño, J., Pinzón, C., Cortes, A., Ballesteros, G., & Santos, A. M. (2016). Farmacogenética del metotrexato en artritis reumatoide. Revisión sistemática. *Revista Colombiana de Reumatología*, 23(2), 102–114.
- Romão, Vasco C., Lima, A., Bernardes, M., Canhão, H., & Fonseca, J. E. (2014). Three decades of low-dose methotrexate in rheumatoid arthritis: Can we predict toxicity? *Immunologic Research*, 60(2–3), 289–310.
- Romão, Vasco Crispim, Canhão, H., & Fonseca, J. E. (2013). Old drugs, old problems: where do we stand in prediction of rheumatoid arthritis responsiveness to methotrexate and other synthetic DMARDs? *BMC Medicine*, 11, 17.
- Schiff, M. H., & Sadowski, P. (2017). Oral to subcutaneous methotrexate dose-conversion strategy in the treatment of rheumatoid arthritis. *Rheumatology International*, 37(2), 213–218.
- Smolen, J. S., Aletaha, D., & McInnes, I. B. (2016). Rheumatoid arthritis. *The Lancet*, 388(10055), 2023–2038.

- Smolen, J. S., Landewé, R., Bijlsma, J., Burmester, G., Chatzidionysiou, K., Dougados, M., *et al.* (2017). EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2016 update. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 76(6), 960–977.
- Sotoudehmanesh, R., Anvari, B., Akhlaghi, M., Shahraeeni, S., & Kolahdoozan, S. (2010). Methotrexate Hepatotoxicity in Patients with Rheumatoid Arthritis, 2(2), 104–109.
- Soukup, T., Barvik, I., Nekvindova, J., Veleta, T., Kubena, A. A., Duintjer Tebbens, J., *et al.* (2018). Are haplotypes in a single methotrexate pathway more predictive for response in rheumatoid arthritis than in different pathways? *Pharmacogenomics*, 19(5), 379–381.
- Spooner, R. J., Smith, D. H., Bedford, D., & Beck, P. R. (1982). Serum gamma-glutamyltransferase and alkaline phosphatase in rheumatoid arthritis. *Journal of Clinical Pathology*, 35(6), 638–641.
- Tian, H., & Cronstein, B. N. (2007). Understanding the mechanisms of action of methotrexate: implications for the treatment of rheumatoid arthritis. *Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases*, 65(3), 168–173.
- Tornero, J., Calvo, J., Rosas, J., Sanmartí, R., Vicente, J., Nolla, J. M., *et al.* (2016). Recomendaciones para el uso de metotrexato en artritis reumatoide establecida: monoterapia y combinación con otros fármacos modificadores de la enfermedad sintéticos o biológicos, 11(1), 29–35.
- Van Riel, P., & Renskers, L. (2014). The development of the disease activity score (DAS) and the disease activity score using 28 joint counts (DAS28). *Clinical and Experimental Rheumatology*, 34(32 (Suppl. 85)), S65–S74.
- Wang, S. M., Sun, L. L., Zeng, W. X., Wu, W. S., & Zhang, G. L. (2014). Influence of genetic polymorphisms of FPGS, GGH, and MTHFR on serum methotrexate levels in Chinese children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 74(2), 283–289.
- Wang, W., Zhou, H., & Liu, L. (2018). Side effects of methotrexate therapy for rheumatoid arthritis: A systematic review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 158, 502–516.
- Yamamoto, T., Shikano, K., Nanki, T., & Kawai, S. (2016). Folypolyglutamate synthase is a major determinant of intracellular methotrexate polyglutamates in patients with rheumatoid arthritis. *Scientific Reports*, 6, 35615.
- Yuasa, H., Inoue, K., & Hayashi, Y. (2009). Molecular and Functional Characteristics of Proton-Coupled Folate Transporter. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98(5), 1608–1616.
- Zampeli, E., Vlachoyiannopoulos, P. G., & Tzioufas, A. G. (2015). Treatment of rheumatoid arthritis: Unraveling the conundrum. *Journal of Autoimmunity*, 65, 1–18.